

Matea Dvorščak

**Inhibitorni učinak alkaloida iz biljne vrste
Corydalis cava (L.) Schweigg.& Körte na
acetilkolinesterazu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija II i izrađen u Zavodu za farmakognoziju u suradnji sa Zavodom za opću i anorgansku kemiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Neposredni voditelj bio je izv. prof. dr. sc. Mario Gabričević.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marijani Zovko-Končić na susretljivosti, stručnoj pomoći, te prilici za rad u laboratoriju. Posebna zahvala dr. sc. Jakubu Chlebeku na velikodušnoj donaciji alkaloida bez kojih ne bi bilo ovog rada. Velika zahvala izv. prof. dr. sc. Mariu Gabričeviću na dobroj volji, savjetima i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala i doc. dr. sc. Tinu Weitneru na svim savjetima. Najviše zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na podršci i razumijevanju tijekom studija te svojim prijateljima.

1. UVOD.....	1
1.1. ALZEIMEROVA BOLEST.....	1
1.1.1. Opis i etiologija.....	1
1.1.2. Simptomi.....	2
1.1.3. Patofiziologija.....	3
1.1.4. Važnost kolinergičkog sustava.....	4
1.2. ACETILKOLIN.....	5
1.3. ACETILKOLINESTERAZA.....	5
1.4. INHIBITORI ACETILKOLINESTERAZE	5
1.4.1. Berberin.....	6
1.4.2. Alkaloidi biljne vrste <i>Corydalis cava</i> Schweigg.& Körte.....	6
1.5. ANALITIČKE METODE.....	8
1.5.1. Fluorimetrija.....	8
1.5.2. MicroScale termoforeza.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. MATERIJAL ZA ISPITIVANJE.....	11
3.1.1. Ispitivani alkaloidi.....	11
3.1.2. Kemikalije.....	11
3.1.3. Uređaji.....	11
3.2. METODE ISPITIVANJA.....	11
3.2.1. Priprema otopine enzima.....	11
3.2.2. Priprema otopina berberina.....	11
3.2.3. Priprema otopine kanadina, kanadalina i koridalina.....	12
3.2.4. Priprema otopine taliktrikavina.....	12
3.2.5. Fluorescencijska mjerenja.....	12
3.2.6. Obilježavanje enzima.....	13
3.2.7. Priprema enzima za MST.....	13
3.2.8. Odabir kapilara	13
3.2.11. MST mjerenja.....	14
3.2.10. Priprema DMSO otopina alkaloida.....	14
3.2.9. Priprema otopine alkaloida i enzima.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
4.1 FLUORIMETRIJSKA MJERENJA.....	15

4.1.1. Berberin.....	15
4.1.2. Kanadin.....	19
4.1.3. Kanadalin.....	22
4.1.4. Koridalin.....	25
4.1.5. Taliktrikavin.....	28
4.2. MST MJERENJA.....	31
5. ZAKLJUČAK.....	32
6. LITERATURA.....	33
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	35
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. ALZHEIMEROVA BOLEST

1.1.1. Opis i etiologija

Alzheimerova bolest danas je najčešća neurodegenerativna bolest i vodeći uzrok demencije u starijih osoba (> 65 godina). Bolest je karakterizirana padom kognitivnih i nekognitivnih funkcija. Dok u većini slučajeva dugotrajna memorija ostaje netaknuta, dolazi do oštećenja kratkotrajne memorije, jezičnih vještina te koncentracije. Rezultat takvih oštećenja je gubitak sposobnosti učenja novih vještina kao i gubitak postojećih. Kada kažemo nekognitivne funkcije primarno mislimo na depresiju, agitaciju, promjene osobnosti, deluzije te halucinacije. Upravo ti čimbenici imaju najveći utjecaj na pad kvalitete života kako samog pacijenta tako i njegovih njegovatelja (McGleenon i sur., 1999.).

Uzrok Alzheimerova bolest danas je još uvijek nepoznat, međutim smatra se da postoje određeni rizični faktori koji doprinose razvoju bolesti. Neki od njih su genetski kao što je Down-ov sindrom ili APOE 4 genotip, međutim mnogi su okolišni te ovise u načinu života. Takvi su rezistencija na inzulin, pretilost, dislipidemija, hipertenzija. Ponađena je poveznica i između razvoja Alzheimerove bolesti i ozljede mozga, upalnih te vaskularnih faktora (<http://emedicine.medscape.com>).

1.1.2. Simptomi

Alzheimerova bolest dolazi u nekoliko stupnjeva, pa tako razlikujemo preklinički stadij, rani stadij, srednji te ozbiljan stadij bolesti. Svaki od stadija razlikuje se u vrsti i ozbiljnosti simptoma koji su navedeni u sljedećoj tablici (Tablica 1).

Tablica 1. Stadiji bolesti s pridruženim simptomima

Preklinički stadij	Rani stadij	Srednji stadij	Ozbiljan stadij
Nema vidljivih simptoma	Gubitak pamćenja	Povećani gubitak pamćenja	Neprepoznavanje članova obitelji i prijatelja
Vidljive promjene u mozgu	Zbunjenost oko lokacija poznatih mjesta	Problemi sa čitanjem, pisanjem, računanjem	Nemogućnost učinkovite komunikacije
	Potrebno dulje vrijeme za obavljanje dnevnih zadataka	Ponavljajuće izjave i kretnje, trzanje mišića	Osjećaj gubitka samoga sebe
	Kompromitirano prosuđivanje	Gubitak kontrole nad ponašanjem	Gubitak težine, infekcije kože
	Promjene raspoloženja	Nemir, uzmemirenost	Nemogućnost kontrole mjehura i crijeva
	Povećana aksioznost	Halucinacije, paranoja	Konvulzije, otežano gutanje

1.1.3. Patofiziologija

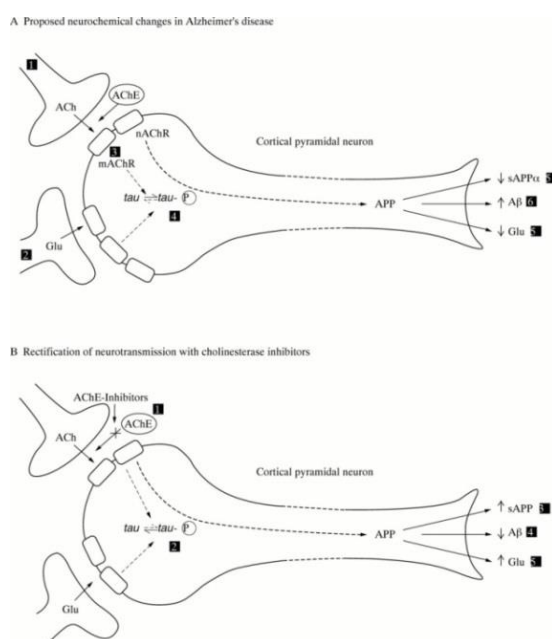
Patofiziologija Alzheimerove bolesti danas još nije do kraja razjašnjena i poznata. Za sada se zna da bolest utječe na tri važna procesa u neuronima, a to su komunikacija, metabolizam i popravak. Ukoliko dođe do poremećaja tih procesa živčana stanica gubi vezu sa drugim neuronima i naposljetku odumire, a odumiranje velikog broja takvih stanica dovodi do već navedenih simptoma bolesti. Važne promjene koje vidimo u mozgu oboljele osobe uključuju neurofibrilarne čvorove i senilne plakove, te je veliki napor uložen u otkrivanje njihova sastava koji bi pomogao u otkrivanju patogeneze Alzheimerove bolesti (<http://emedicine.medscape.com>).

Plakovi su guste, uglavnom netopive nakupine proteina i staničnog materijala, a nalaze se izvan i oko neurona. Sastoje se od β amiloida, koji je nastaje enzimskim kidanjem proteina nazvanog amiloidni prekursorski protein (APP). Razvijaju u hipokampusu i drugim područjima cerebralnog korteksa odgovornim za razmišljanje i donošenje odluka. Mogu se pojaviti već u ranim pedesetim godinama, te još nije poznato jesu li plakovi uzrok ili nusprodukt bolesti (<http://emedicine.medscape.com>)

Neurofibrilarni čvorovi su netopljive nakupine vlakana koji se razvijaju unutar neurona. Iako mnoge starije osobe razvijaju čvorove i plakove kod osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti oni se mogu naći u većoj količini i u određenim područjima mozga važnim za pamćenje. Primarno i najgušće su raspoređeni u srednjem i krajnjem dijelu temporalnog režnja te najviše utječu hipokampus. Sa napretkom bolesti čvorovi se nakupljaju i u drugim područjima mozga gdje se nalaze senzorna i motorna područja. Iako su čvorovi i plakovi specifični za Alzheimerovu bolest oni nisu patognomični, jer čvorove nalazimo i u drugim neurodegenerativnim bolestima, a plakove možemo naći i u normalnom starenju (<http://emedicine.medscape.com>).

1.1.4. Važnost kolinergičkog sustava

Vrlo važan sustav u funkciji pamćenja je kolinergički sustav (Slika 1). Njegov nedostatak ili smanjena aktivnost uključena je u pad kognitivnih sposobnosti i promjena raspoloženja u Alzheimerovoj bolesti. Tijekom godina je razvijena „kolinergička hipoteza“ koja u osnovi navodi da gubitak kolinergičke funkcije u središnjem živčanom sustavu značajno pridonosi kognitivnom slabljenju povezanom sa starijom dobi i Alzheimerovom bolesti (Terry i Buccafusco, 2003). Vrlo važno saznanje bilo je otkriće da su neuroni čija je membrana izložena β amiloidu izloženi selektivnom propadanju kolinergičkih neurona. Zbog važnosti taloženja β amiloida u mozgu od velikog je interesa odnos između amiloidnog taloženja i kolinergičke neuronske aktivnosti. Agonisti za M1 podtip muskariskih receptora podižu razinu α amiloidnog prekursora proteina (α APP) a smanjuju razinu β amiloida. M1 agonisti također mogu smanjiti fosforilaciju τ proteina te tako imaju učinak na neufobrilarne čvorove. Aktivnost enzima kolin acetiltrasferaze (ChAT) i acetilkolinesteraze (AChE) bitno je smanjena u cerebralnom korteksu, hipokampusu i amigdali oboljelih osoba, a studijama je utvrđeno da je gubitak kortikalnog ChAT i smanjena sinteza acetilkolina povezano sa kognitivnim oštećenjem (<http://emedicine.medscape.com>). Terapija inhibitorima acetilkolinesteraze povezana je sa poboljšanjem brojnih simptoma, uključujući depresiju, psihozu i agitaciju. Također je važno napomenuti da takva terapija dovodi do poboljšanja učenja i pamćenja (Terry i Buccafusco, 2003).



Slika 1. Kolinergički sustav u Alzheimerovoj bolesti
(Francis i sur.,1999)

1.2. ACETILKOLIN

Acetilkinolin je prvi otkriveni neurotransmiter. U autonomnom živčanom sustavu neurotransmiter je na simpatičkim i parasimpatičkim neuronima. Vrlo je značajna kolinergička projekcija iz jezgre bazalnog Meynerta do frontalnog neokorteksa i povezanih limbjskih struktura, a upravo degeneracija tog dijela važna je u patogenezi Alzheimerove bolesti. Tijekom neurotransmisije acetilkinolin se oslobađa iz živca u sinaptički rascjep i veže se na ACh receptore na postsinaptičkoj membrani, prenoseći signal. Acetilkinolinesteraza također smještena na postsinaptičkoj membrani, prekida prijenos signala hidrolizom acetilkolina. Oslobođeni kolin iz acetilkolina ponovno preuzima presinaptički živac, a novi neurotransmiter se sintetizira kombiniranjem s acetyl-CoA djelovanjem kolin acetyltransferaze (Čolović i sur., 2013).

1.3. ACETILKOLINESTERAZA

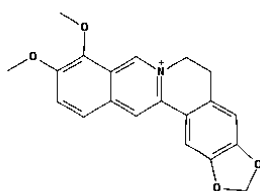
Acetilkinolinesteraza (AChE) je serinska hidrolaza koja se nalazi na neuromuskularnim spojevima i kolinergičkoj sinapsi u mozgu. Glavna uloga AChE je prestanak prijenosa signala na kolinergičkoj sinapsi, i to hidrolizom acetilkolina do kolina i acetata. AChE ima visoku katalitičku aktivnost, pa tako jedna molekula AChE razgradi 25 000 molekula acetilkolina. Poznavanje strukture AChE važno je za razumijevanje visoke katalitičke aktivnosti i objašnjenja mehanizma djelovanja u svrhu razvoja lijekova (Čolović i sur., 2013).

1.4. INHIBITORI ACETILKOLINESTERAZE

Inhibitori acetilkinolinesteraze inhibiraju enzim i time povećavaju koncentraciju acetilkolina u sinaptičkoj pukotini. Prema načinu djelovanja razlikujemo reverzibilne i ireverzibilne inhibitore. Reverzibilni inhibitori, bilo kompetitivni ili nekompetitivni, imaju terapijsku primjenu, dok su ireverzibilni povezani toksičnim učincima. Iako ne postoji terapija za Alzheimerovu bolest, inhibitori AChE se koriste za simptomatsko liječenje. Inhibitori djelovanjem na AChE smanjuju razgradnju acetilkolina te povećavaju njegovu koncentraciju, povećavajući kolinergičku transmisiju u predjelima frontalnog korteksa kompenzirajući time gubitak funkcionalnih stanica mozga. Nažalost nijedan od tih lijekova ne može usporiti ili zaustaviti razvoj bolesti (Čolović i sur., 2013).

1.4.1. Berberin

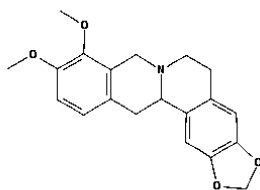
Berberin (Slika 2) je alkaloid iz skupine benzilizokinolinskih alkaloida. Nalazimo ga u raznim biljkama, kao što su *Berberis vulgaris* L., *B. aristata* DC., Berberidaceae. Berberin obično nalazimo u kori, podanku, korijenu i stabljici tih biljnih vrsta. Ima antisekretorno, antiupalno, antibakterijsko, antimalarijsko, ali i antikancerogeno djelovanje. Također je pokazano da je berberin inhibitor acetilkolinesteraze te u štakora može poboljšati amneziju uzrokovanu skopolaminom (Xiang i sur., 2009).



Slika 2. Struktura berberina

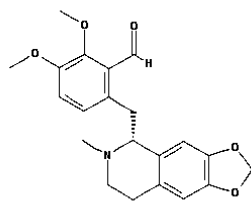
1.4.2. Alkaloidi biljne vrste *Corydalis cava* Schweigg.& Körte

Kanadin (Slika 3) je protoberberinski alkaloid koji se može naći u biljkama *Hydrastis canadensis* L., Ranunculaceae i *Corydalis cava* (L.) Schweigg.& Körte, Papaveraceae (Chlebek i sur, 2011).



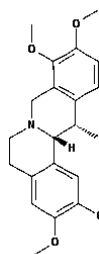
Slika 3. Struktura kanadina

Kanadalin (Slika 4) je alkaloid iz porodice sekoberberina, oba njegova enantiomera su nađena u biljci *C. cava* (L.), dok je u biljci *Hydrastis canadensis* L., Ranunculaceae nađen samo (S) – enantiomer (Meyer i Imming, 2008).



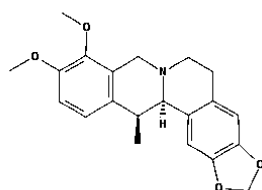
Slika 4. Struktura kanadalina

Koridalin (Slika 5) je alkaloid izvorno nađen u gomolju biljaka roda *Corydalis*.sp. (Chlebek i sur., 2011).



Slika 5. Struktura koridalina

Taliktrikavin (Slika 6) je protoberberinski alkaloid izoliran iz biljke *C. cava* (Rueffer i sur., 1994).



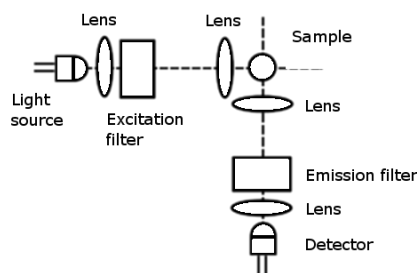
Slika 6. Struktura taliktrikavina

1.5. ANALITIČKE METODE

1.5.1. Fluorimetrija

Fluorimetrija je kvantitativna metoda mjerenja fluorescencije. Fluorescencija je otkrivena sredinom 1800-ih, a predstavlja emisiju svjetlosti prilikom vraćanja iz pobuđenog u osnovno stanje. Fotoni svjetlosti određene valne duljine apsorbirani su od strane fluorofora, te pobuđuju njegove elektrone. Takvo pobuđeno stanje može trajati svega par nanosekundi, a nakon toga sustav se vraća u osnovno stanje. Tijekom tog povratka dolazi do elektronske emisije fotona. Valna duljina emitiranog fotona veća je od apsorbirane valne duljine što odgovara činjenici da je energija emitiranog fotona manja od one apsorbiranog. Taj fenomen poznat je pod nazivom Stokesov pomak. Intenzitet fluorescencije ovisi o okolišu, pH i polarnosti otapala, te temperaturi na kojoj se vrše mjerenja. Pristutnost i vezanje drugih molekula također ima utjecaj na intenzitet fluorescencije. Neke molekule imaju prirodnu, intenzivnu fluorescenciju pa ih nazivamo intrinzičnim fluoroforima. Primjer su proteini čije su aminokiseline tirozin i triptofan odgovorne za fluorescenciju. Vezanjem neke manje molekule na protein može doći do smanjenja intenziteta fluorescencije i upravo to svojstvo koristit ćemo u ovom radu (Hegy i sur., 2013).

Fluorimetar, prikazan na slici 6, je uređaj kojim mjerimo fluorescenciju. On mjeri sposobnost uzorka da apsorbira svjetlost na jednoj, a emitira je na drugoj valnoj duljini. Fluorimetar koristi optičke filtere kako bi osigurao svjetlost potrebne valne duljine. Izvor šalje svjetlost u rasponu pobudnih valne duljine spoja koji se mjeri. Svjetlost prolazi kroz ekscitacijski filter koji prenosi valne duljine specifične za ekscitacijski spektar spoja i blokira druge valne duljine. Svjetlost prolazi i pobuđuje uzorak, a svjetlost koju emitira uzorak prolazi kroz emisijski filter. Emitirana svjetlost mjeri se detektorom, a na instrumentu se prikazuje vrijednost fluorescencije (Hegy i sur., 2013).

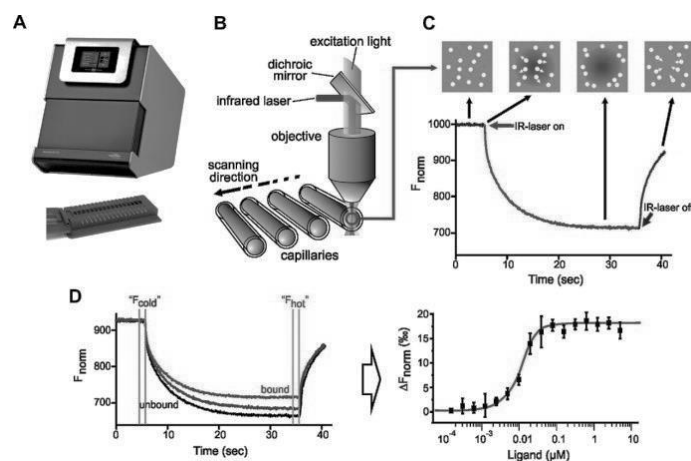


Slika 6. Shema fluorimetra

1.5.2. MicroScale termoforeza

MicroScale termoforeza (MST) (Slika 7) je tehnika koja omogućava kvantificiranje bioloških interakcija. Zadnjih se godina pojavila kao revolucionarna metoda za praćenje usmjerenog gibanja fluorescentnih molekula kroz mikroskopske temperaturne gradijente u μl volumena, omogućujući pritom preciznu analizu interakcija bilokojih molekula, neovisno o veličini i drugim fizičkim svojstvima. Temelji se na termoforezi, tj. usmjerenom gibanju molekula u gradijentu temperature. Kretanje značajno ovisi o raznim molekulnim svojstvima kao što su veličina, naboj ili konformacija. Termoforeza proteina tipično se značajno razlikuje od termoforeze kompleksa protein – ligand zbog promjena u veličini, naboju induciranih vezanjem. Čak i ako vezanje značajno ne mijenja veličinu ili naboj proteina, MST još uvijek može otkriti vezanje zbog promjena u entropiji solvatacije molekula (Willemsena i Andréa, 2014).

U uređajima serije Monolith, termoforeza se inducira i detektira u malim staklenim kapilarama koje sadrže otopinu fluorescentnih molekula. Infracrveni laser s emisijskom valnom duljinom od 1480 nm usmjeren je u kapilaru i proizvodi mikroskopski temperaturni gradijent koji obuhvaća $2 - 6^\circ\text{C}$ u kapilari promjera $\sim 50\ \mu\text{m}$. Tijekom izazvanog temperaturnog gradijenta, fluorofori u otopini su pobuđeni i intenzitet emitirane fluorescencije se skuplja. Za dobivanje konstante vezanja potrebno je da u kapilarama ima jednaka koncentracija fluorofora, te rastuće koncentracije liganda. Kapilare se skeniraju uzastopno i detektira se termoforeza. Promjene u termoforezi fluorescentnih molekula zbog vezanja liganda mogu se zatim upotrijebiti za izračunavanje konstante vezanja (Willemsena i Andréa, 2014).



Slika 7. MST

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Alzheimerova bolest danas je najčešći oblik demencije, odgovorna za 50 – 60% svih slučajeva demencije u više od 65% svjetske populacije. Iako je vrlo raširena i proučavana sve do danas jedini oblik dostupne terapije čine lijekovi koji spadaju u skupinu inhibitora acetilkonesteraze. Danas se sve više lijekovi traže u prirodi, posebno se tu ističu alkaloidi koji su poznati zbog svog širokog područja djelovanja. Mnogi dosad poznati AChE inhibitori dolaze upravo iz biljaka. Galantamin i huperizin A jedni su od takvih lijekova, međutim uvijek postoji potreba za lijekom sa većom efikasnošću i manje nuspojava. S obzirom na poznato djelovanje berberina kao inhibitora acetilkonesteraze, postavilo se pitanje djelovanja alkaloida sličnih berberinu. U ovom radu su ispitani kanadin, kanadalin, koridalin i taliktrikavin.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJAL ZA ISPITIVANJE

3.1.1. Ispitivani alkaloidi

Alkaloidi kanadin, kanadalin, koridalin i taliktrikavin su izolirani iz biljne vrste *Corydalis cava* (L.) Schweigg.& Körte, Papaveraceae. Izolacija i karakterizacija su opisane u literaturi (Chlebek i sur., 2011).

3.1.2. Kemikalije

Berberin klorid, destilirana voda, tris pufer (pH = 8,0), fosfatni pufer (pH = 7,4) DMSO, acetilkolinesteraza (AchE iz *Electrophorus electricus*, Sigma Aldrich), Monolith NT His-Tag Labeling Kit.

3.1.3. Uredaji

U mjerenjima su korišteni sljedeći uređaji: Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, Njemačka), ultrazvučna kupelj (Sper Scientific, SAD), analitička vaga (Sartorius, Hrvatska), Olis RSM 1000 fluorimetar (Olis, Inc., SAD), laboratorijska cerifuga, laboratorijska centrifuga s hlađenjem.

3.2. METODE ISPITIVANJA

3.2.1. Priprema otopine enzima

Enzim je priređen tako da je u bočicu sa liofiliziranim enzimom, gdje je navedeno da je masa 1 mg, dodabno 1 ml tris pufera te je dobivena koncentracija enzima od 4 μ M. Ta originalna otopina u svim mjerenjima je razrjeđena 10 puta, te je za mjerenja korištena koncentraciju enzima od 0,4 μ M.

3.2.2. Priprema otopina berberina

Za određivanje točnih uvjeta za mjerenje alkaloida, prvo je mjerenje rađeno sa berberinom prema literaturi (Xiang i sur., 2009).

Otopina je pripremljena tako da je 1 mg berberina otopljen u 10 ml tris pufera, te je dobivena koncentracija od 0,297 mM.

3.2.3. Priprema otopine kanadina, kanadalina i koridalina

Otopine ovih alkaloida pripremljene su na način jednak berberinu, tj. 1 mg alkaloida otopljen je u 10 ml tris pufera i dobivena je otopina koncentracije 0,269 mM. Zbog težeg otapanja alkaloida korištena je ultrazvučna kupelj.

3.2.4. Priprema otopine taliktrikavina

Zbog slabije topljivosti taliktrikavina u odnosu na ostale alkaloidne, otopina je priređena u manjoj koncentraciji i uz pomoć ultrazvučne kupelji. Otapanjem 1,8 mg u 27 ml dobivena je koncentracija od 0,188 μ M.

Osim otopine taliktrikavina u tris puferu, za mjerenja je korištena i 10%-tna otopina DMSO-a koja je priređena otapanjem 0,3 mg alkaloida u 2700 μ l destilirane vode i 300 μ l DMSO-a. Koncentracija tako dobivene otopine je 0,283 mM

3.2.5. Fluorescencijska mjerenja

Rađeno je 16 mjerenja, i to tako da je u prvom mjerenju ispitan sam enzim, a nakon toga je dodana otopina alkaloida u koncentracijama 2-30 μ M. U kivetu za mjerenje stavljeno je 0,4 ml enzima i u svakom sljedećem mjerenju dodano po 3 μ l otopine enzima.

Pobudna valna duljina koja je korištena bila je 295 nm, a vrijeme skupljanja podataka 20 sekundi. Prije mjerenja s enzimom, izmjeren je spektar samog alkaloida u koncentraciji od 30 μ M kako bi se vidjelo apsorbira li alkaloid na valnoj duljini na kojoj se mjeri.

3.2.6. Obilježavanje enzima

Metoda poput MST zahtjeva da enzim bude obilježen fluorescentnom bojom, a ta se boja može vezati na amine, stoga je tris puferu kojem je bio otopljen enzim morao biti uklonjen jer sadrži slobodne amine. Korištene su Zeba kolone koje su napunjene sa „Labeling“ puferom i centrifugirane tri puta po 60 sekundi na 1500 G, ostatak koji se nije vezao za kolonu je bačen. Nakon toga na istu Zeba kolonu je stavljeno 100 µl otopine enzima u tris puferu i centrifugirano 120 sekundi na 1500 G. U ostatak, koji je prošao kroz kolonu dodano je 20 µl boje i 90 µl „Labeling“ pufera i ostavljeno na tamnom mjestu 90 minuta.

3.2.7. Priprema enzima za MST

Otopina je pripremljena na način da je kroz Zeba kolonu pušteno 3 puta po 3 ml tris pufera, a zatim dodano 200 µl obilježenog enzima. Kada je enzim ušao u kolonu dodano je 30 µl tris pufera, te naknadno još 600 µl i početo skupljanje frakcija. Skupljene su dvije frakcije od kojih je druga dalje korištena.

3.2.8. Odabir kapilara

Prvo je napravljena otopinu enzima za odabir kapilara. Otopina je napravljena tako da je uzeto 25 µl obojenog enzima i dodano 225 µl pufera čime je dobivena koncentracija enzima od 0,2 µM. Kako bi bila odabrali najprikladnija vrsta kapilara, uzeto je po 4 od sljedećih vrsta: Monolith NT.115 Standard Treated Capillaries, Monolith NT.115 Hydrophobic Capillaries i Monolith NT.115 MST Premium Coated Capillaries. Zatim su sve kapilare napunjene sa otopinom enzima i pokrenut je tzv. cap scan, koji je ponovljen i nakon 30 minuta, te su standardne kapilare izabrane kao najbolje za mjerenja.

3.2.9. Priprema otopine alkaloida i enzima

Za ovo mjerenje napravljena je otopina alkaloida koncentracije 1 mM, što je dobiveno otapanjem 1 mg alkaloida u 3 ml tris pufera. Obojena otopina proteina za sljedeća mjerenje je morala biti razrijeđena na način da je uzeto 10 µl obojene frakcije i dodano 190 µl pufera, čime je dobivena otopina enzima koncentracije 100 nM. Zatim je otopina centrifugirana na hladnom 15 minuta na 10 000 G.

3.2.10. Priprema DMSO otopina alkaloida

Zbog slabe topljivosti alkaloida u tris puferu, napravljene su i približno 20% - tne otopine DMSO-a. Otopina taliktrikavina dobivena je otapanjem 1,3 mg alkaloida u 100 μ l destilirane vode i 100 μ l DMSO, te 27 μ l dobivene otopine razrijeđeno je s 23 μ l destilirane vode. Time je dobivena otopina koncentracije 10 mM sa udjelom DMSO od 27%. Otopina kanadina dobivena je otapanjem 0,3 mg alkaloida u 68 μ l destilirane vode i 20 μ l DMSO. Time je dobivena otopina koncentracije 10 mM sa udjelom DMSO od 22%. Otopina koridalina dobivena je otapanjem 0,3 mg alkaloida u 63 μ l destilirane vode i 18 μ l DMSO. Time je dobivena otopina koncentracije 10 mM sa udjelom DMSO od 22%.

3.2.11. MST mjerenja

Pripremljeno je 16 malih eppendorfica te u 2., 3., 4., ..., 16. stavljeno po 10 μ l tris pufera. Zatim je u prvu eppendorficu stavljeno 10 μ l alkaloida. U 2. eppendorficu također je stavljeno 10 μ l alkaloida, promiješano pipetom i iz 2. uzeto 10 μ l te stavljeno u 3, zatim iz 3. u 4., te tako razrijeđeno do kraja. Na kraju je iz 16. eppendorfice uzeto 10 μ l i bačeno. Nakon toga u sve po redu dodano je još 10 μ l otopine enzima. Kapilare su po redu punjene otopinama iz eppendorfica i pokrenuto mjerenje.

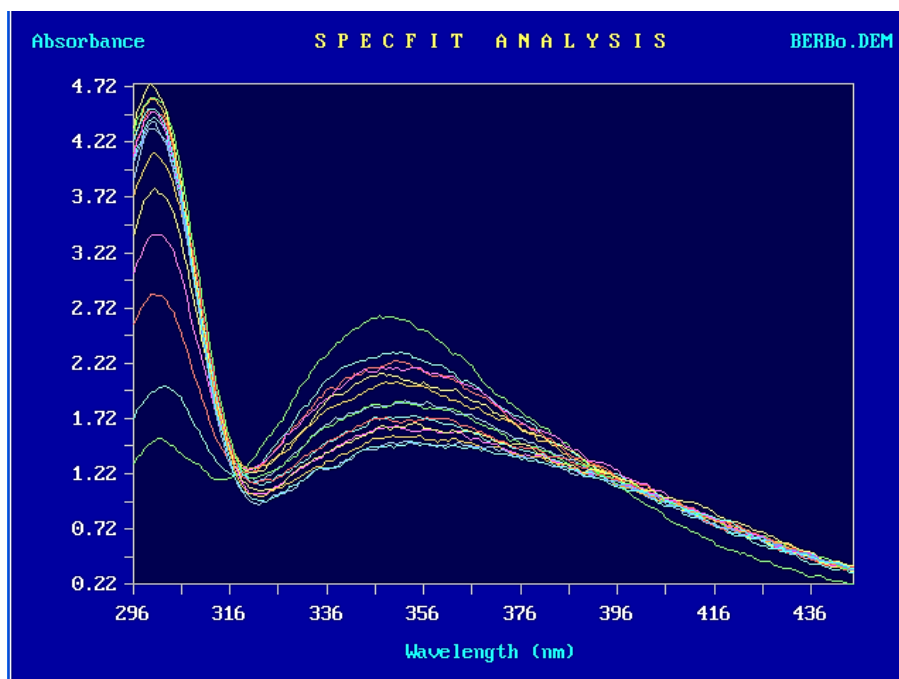
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FLUORIMETRIJSKA MJERENJA

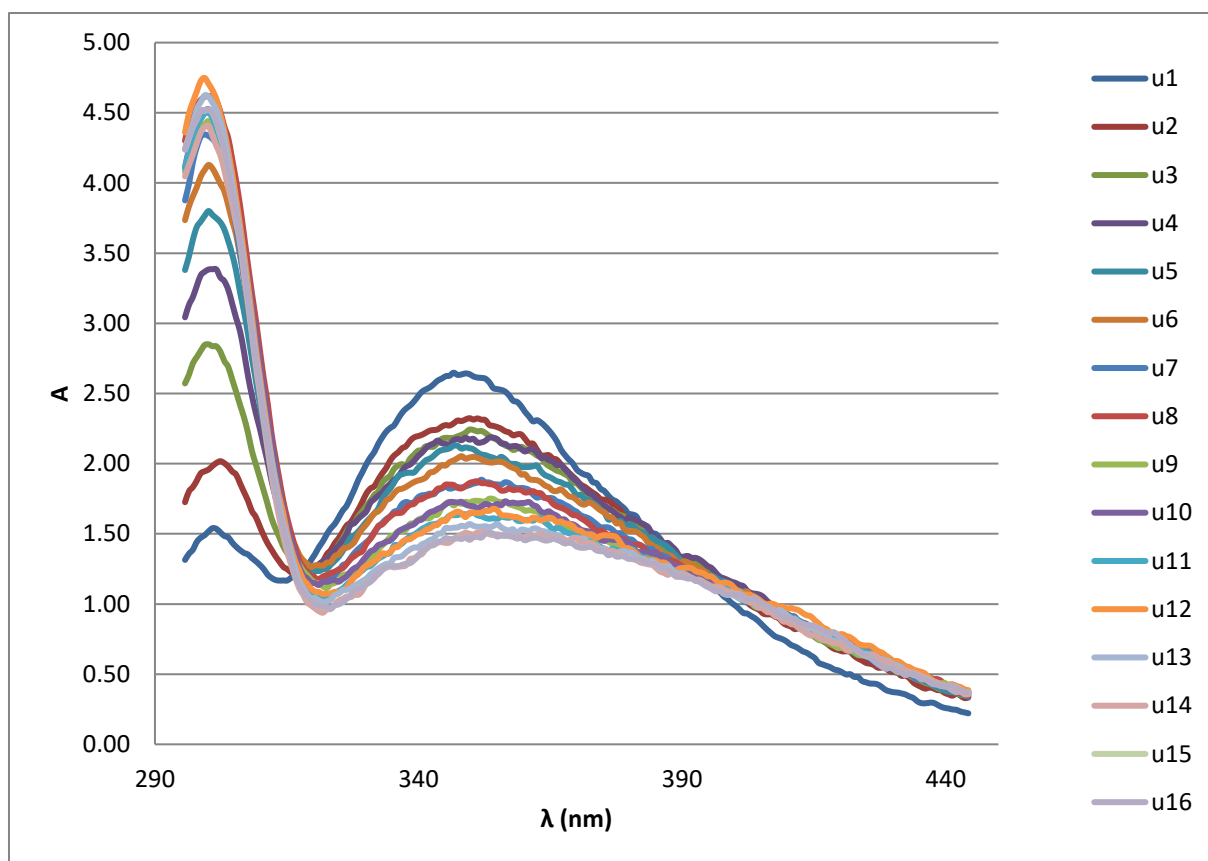
Rezultati dobiveni snimanjem sa Olis fluorimetrom, analizirani su pomoću Specfit programa. Analizom u Specfit – u dobiveni su podatci koji će biti prikazani u nastavku.

4.1.1. Berberin

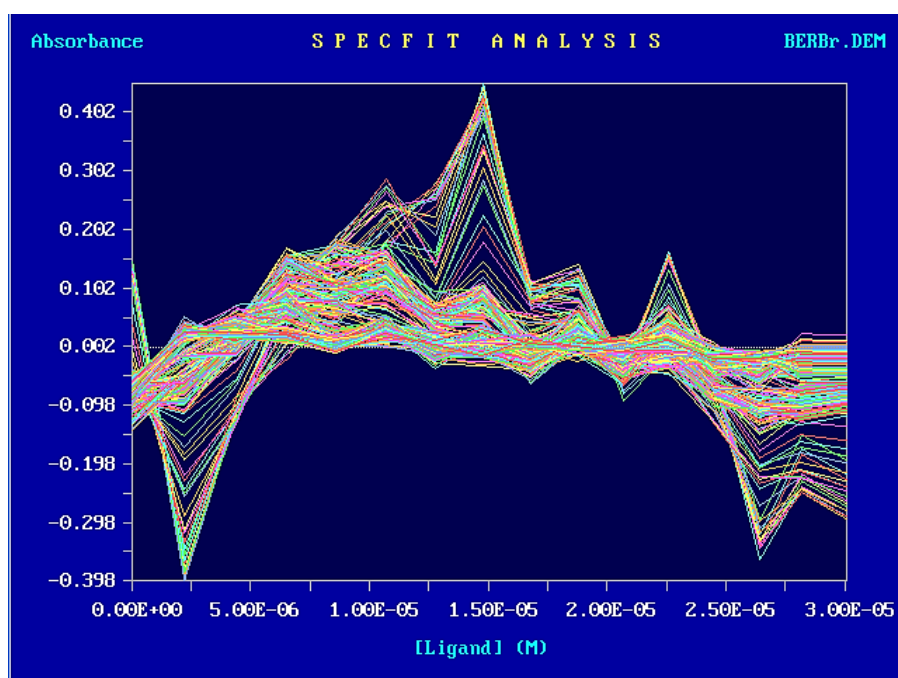
Berberin je u ovom radu služio kao primjer. Dokazan kao inhibitor acetilkolinesteraze. poslužio nam je za namještanje uvjeta mjerenja, te kao pozitivan prikaz analiziranih podataka. Stoga će u radu biti prikazani i rezultati analize mjerenja berberina.



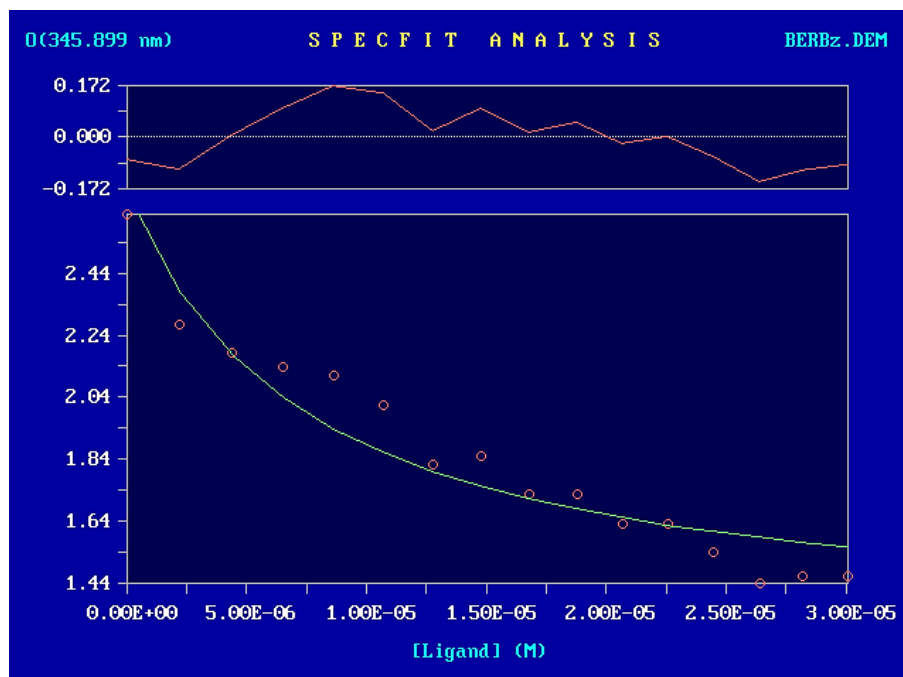
Slika 8. Apsorpcijski spektri otopina acetilkolinesteraze i berberina



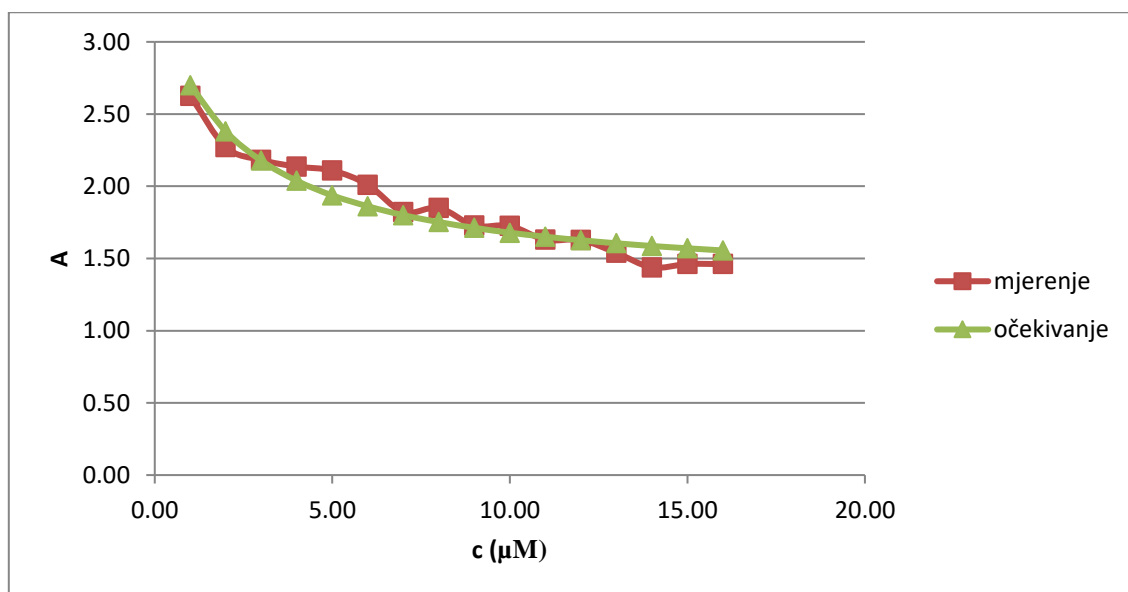
Graf 1. Prikaz apsorpcijskih spektara svih 16 uzoraka različitih koncentracija berberina



Slika 9. Prikaz apsorbancije u odnosu na koncentraciju berberina (pogreška mjerenja)



Slika 10. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije berberina na valnoj duljini od 345 nm



Graf 2. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije (μM) berberina na valnoj duljini od 345 nm

BERB.DEM		S P E C F I T M O D E L M E N U			09-01-2017
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log B)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	5.13358D+00	8.32839D-02

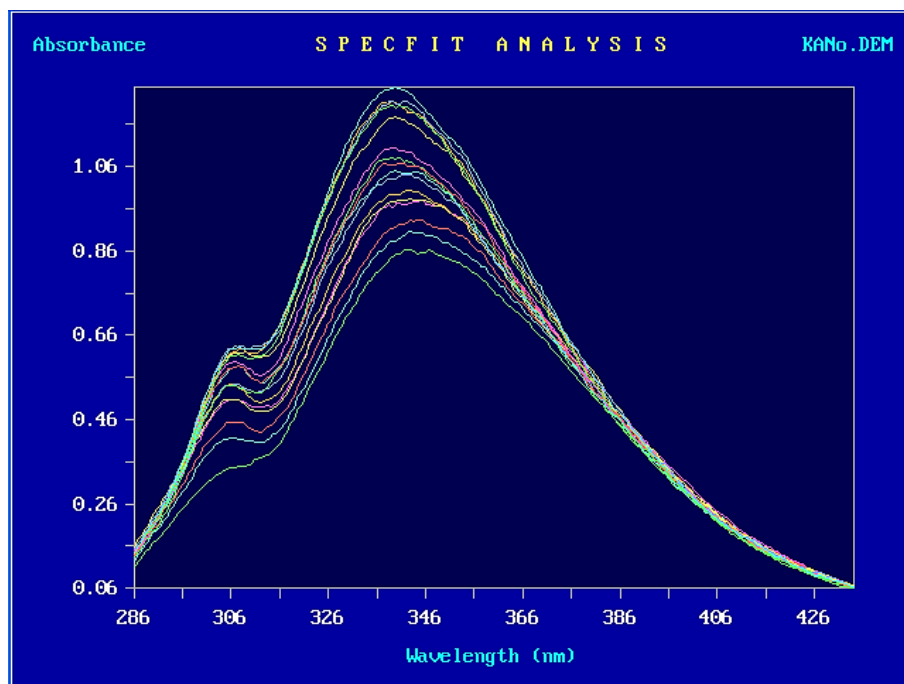
Slika 11. Prikaz modela koji je korišten u analizi te konstanta vezanja sa pogreškom

Slika 9 prikazuje pogrešku mjerenja čime je pokazano da je mjerenje dobro odrađeno. Iz navedenih podataka može se zaključiti kako berberin zbilja ima utjecaj na acetilkolinesterazu. Iz apsorpcijskih spektara na slici 8 i grafu 1 vidi se da se povećanjem koncentracije liganda, u ovom slučaju berberina, smanjuje fluorescencija acetilkolinesteraze. Isti zaključak može se donijeti i na temelju slike 10 i grafa 2.

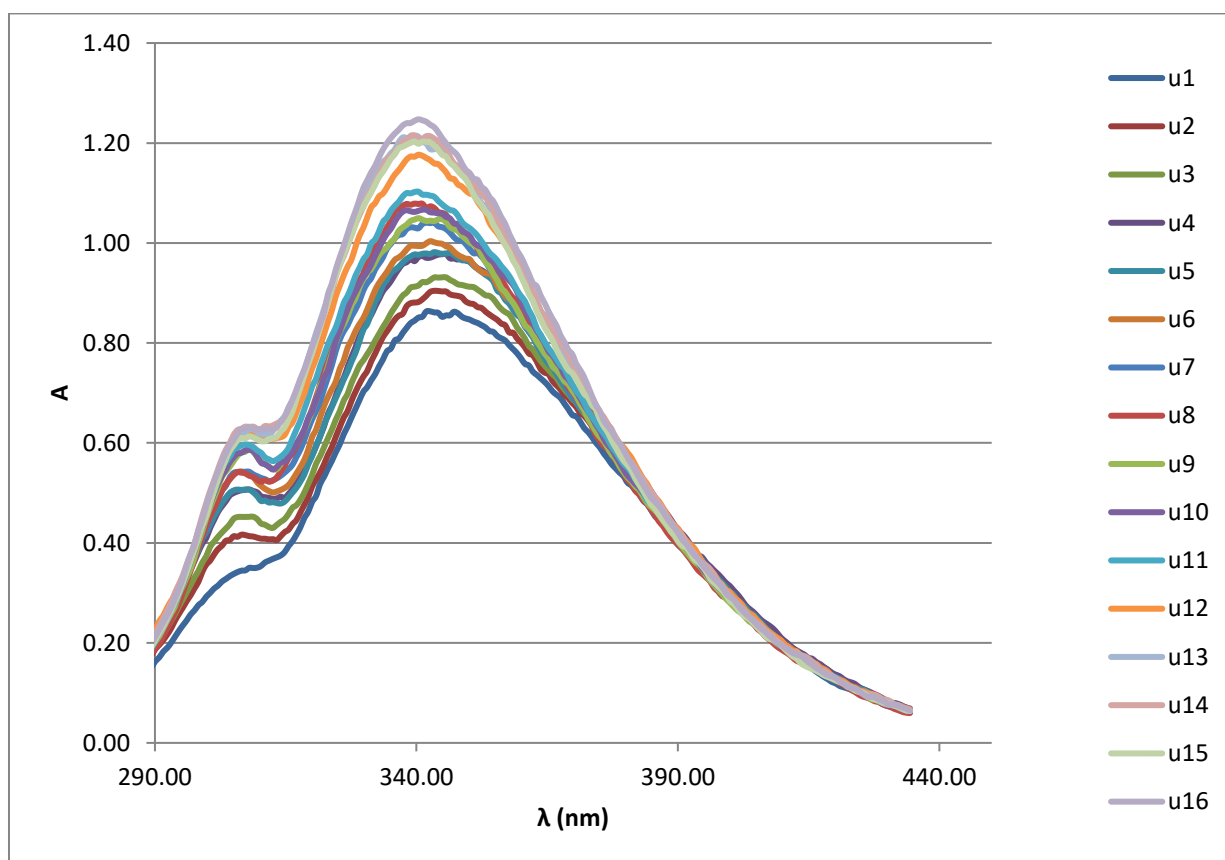
Na slici 11 prikazan je i veoma važan podatak, a to je logaritam konstante vezanja K_d , iz čega slijedi:

$$K_d = 10^{5,13} \pm 8,3 \%$$

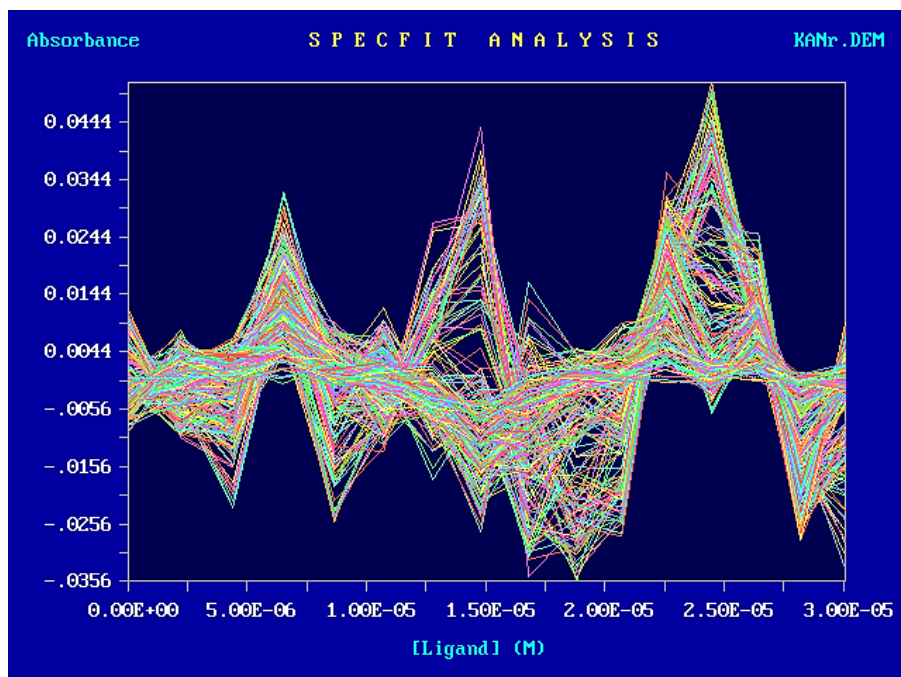
4.1.2. Kanadin



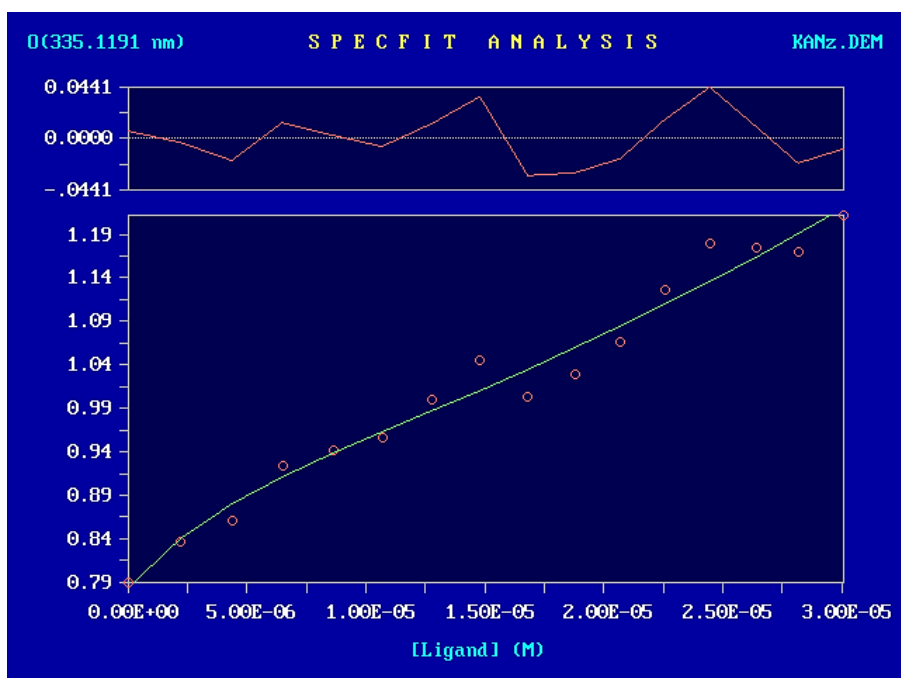
Slika 12. ApSORPCIJSKI spektri otopina acetilkolinesteraze i kanadina



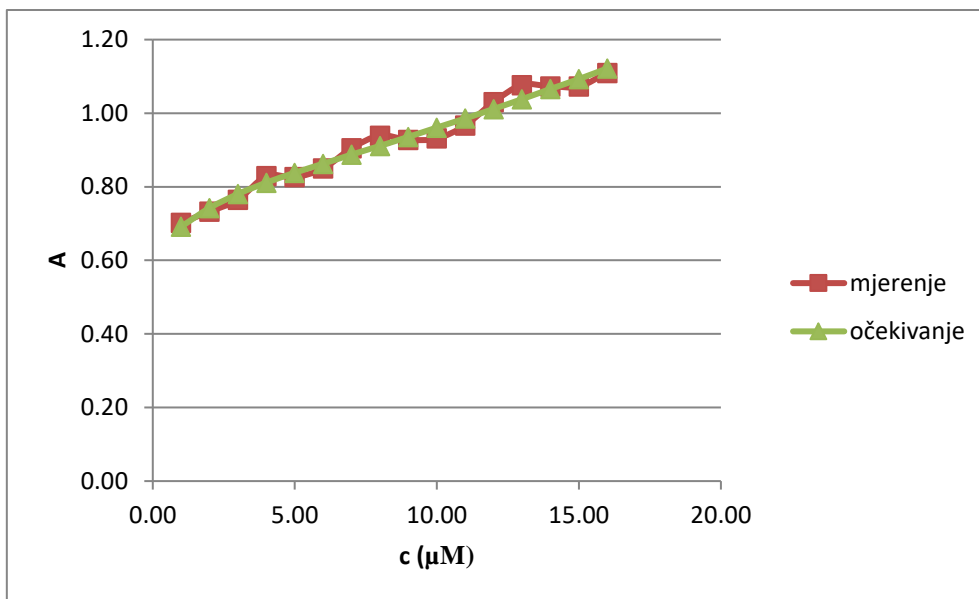
Graf 3. Prikaz apSORPCIJSKIH spektara svih 16 uzoraka različitih koncentracija kanadina



Slika 13. Prikaz apsorbancije u odnosu na koncentraciju kanadina (pogreška mjerenja)



Slika 14. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije kanadina na valnoj duljini od 335 nm



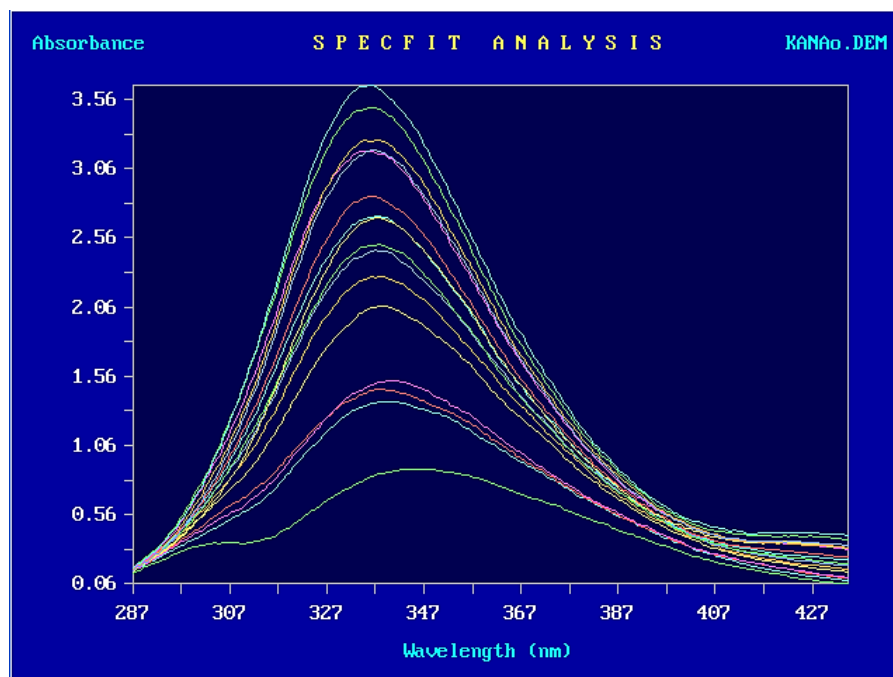
Graf 4. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije (μM) kanadina na valnoj duljini od 335 nm

KAN.DEM		SPECFIT MODEL MENU			09-01-2017
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log B)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	y	km	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	4.95084D+00	3.07215D-01

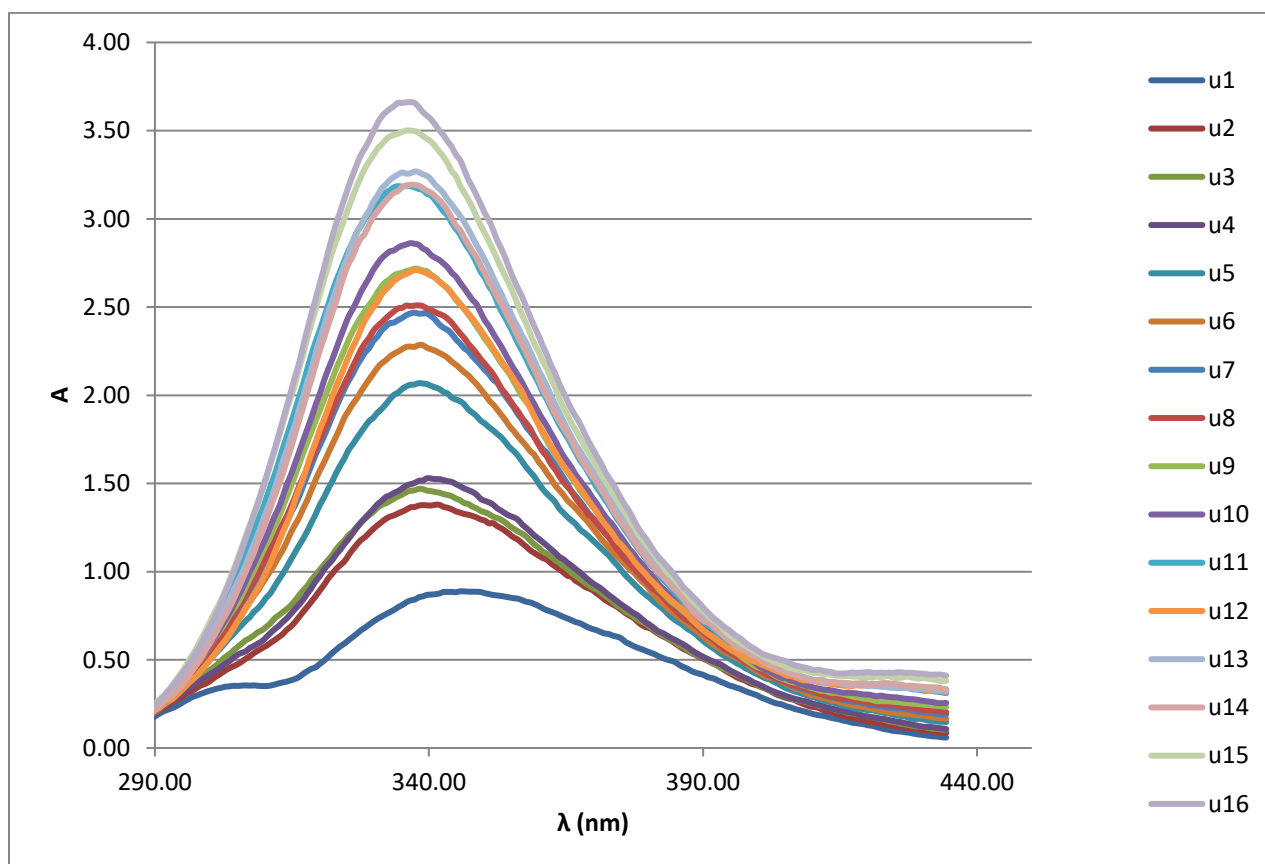
Slika 15. Prikaz modela koji je korišten u analizi te konstanta vezanja sa pogreškom

Iz prikazanih podataka analize (slika 12 i graf 3) mjerenja sa kanadinom može se zaključiti da mjerenja nisu dala očekivane rezultate. Kao što je prikazano na slici 14 i grafu 4 fluorescencija raste sa dodatkom liganda, u ovom slučaju kanadina. Dobivanje takvog rezultata može se objasniti time da sam kanadin jako apsorbira u istom valnom području kao i acetilkolinesteraza, stoga povećanjem njegove koncentracije raste i fluorescencija. Zbog toga nisu dobivene valjanje rezultate konstante vezanja. (Slika 15). Slika 13 prikazuje pogrešku mjerenja čime je pokazano da je mjerenje dobro odrađeno.

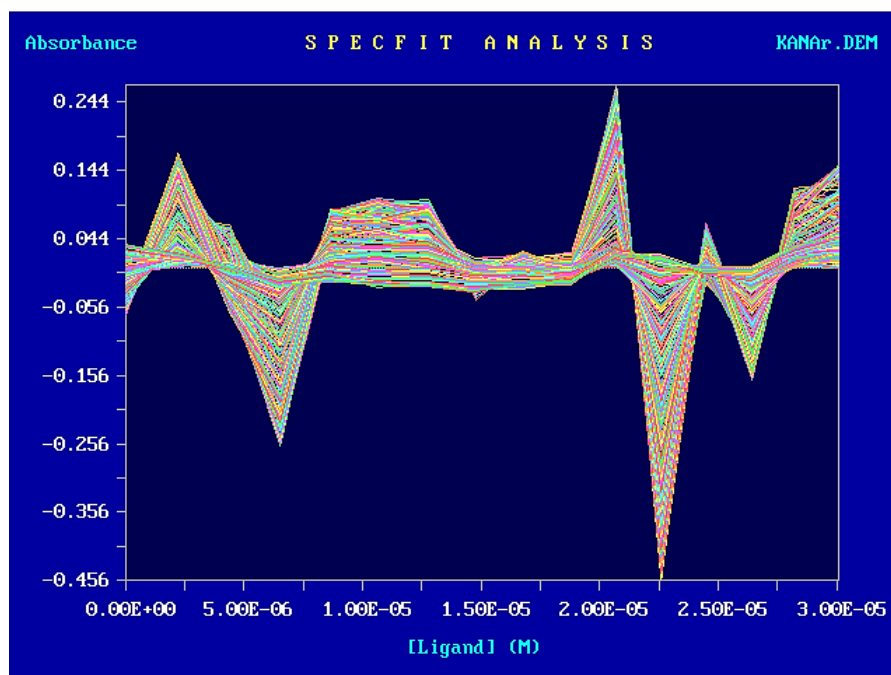
4.1.3. Kanadalin



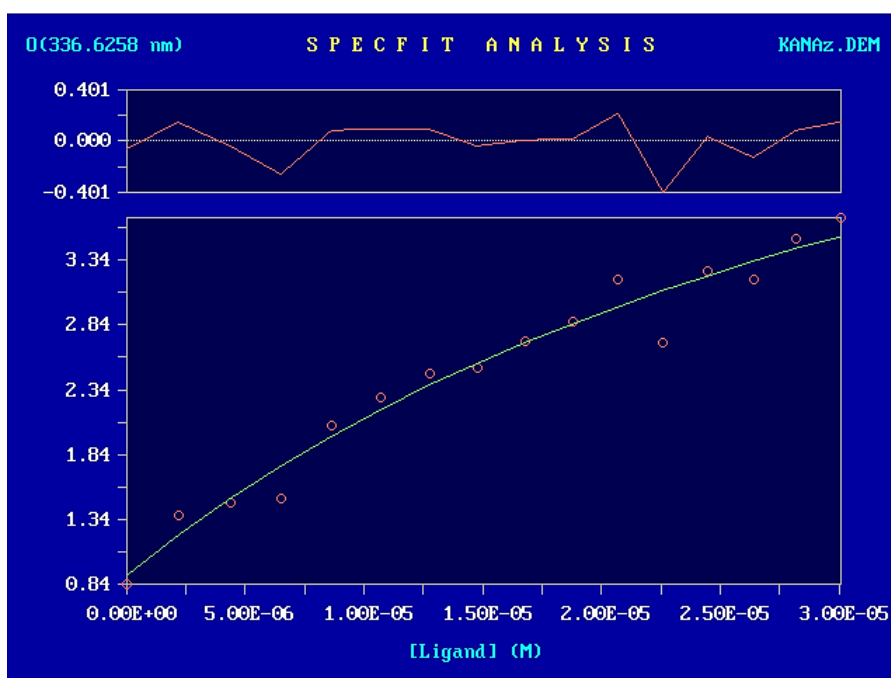
Slika 16. Apsorpcijski spektri otopina acetilkolinesteraze i kanadalina



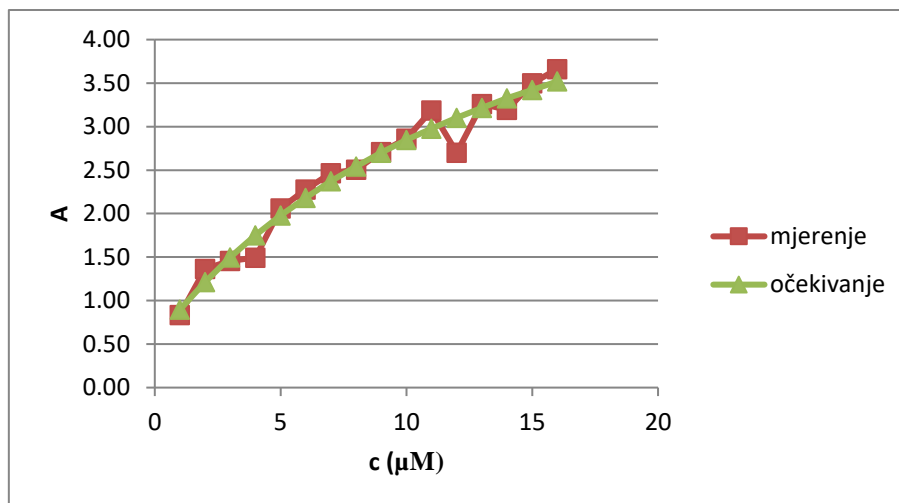
Graf 5. Prikaz apsorpcijskih spektara svih 16 uzoraka različitih koncentracija kanadalina



Slika 17. Prikaz apsorbancije u odnosu na koncentraciju kanadalina (pogreška mjerenja)



Slika 18. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije kanadalina na valnoj duljini od 336 nm



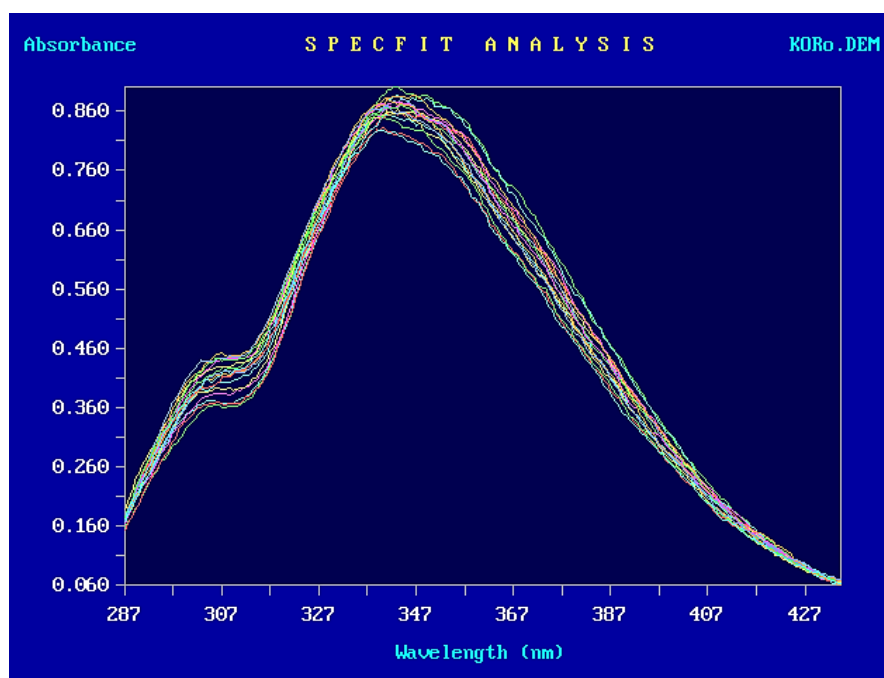
Graf 6. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije (μM) kanadalina na valnoj duljini od 336 nm

KANA.DEM		SPECFIT MODEL MENU			09-01-2017
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log β_{xyz}	$\sigma(\log \beta)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β		
100	y	u	f	0.000000+00	0.000000+00
010	n	u	f	0.000000+00	0.000000+00
110	y	u	v	4.393930+00	1.210980-01

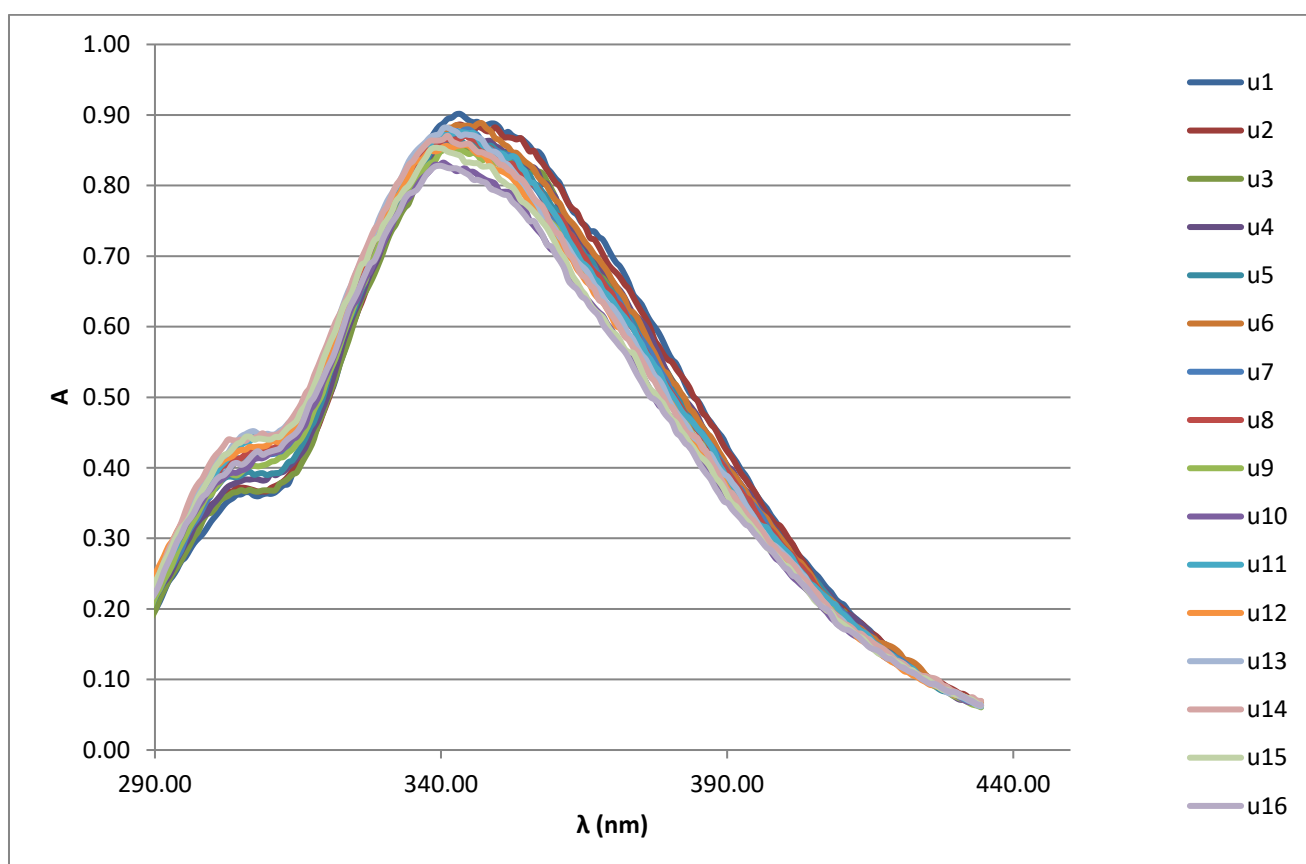
Slika 19. Prikaz modela koji je korišten u analizi te konstanta vezanja sa pogreškom

Iz prikazanih podataka analize (Slika 16 i graf 5) mjerenja sa kanadalinom može se zaključiti, kao i sa kanadinom, da mjerenja nisu dala očekivane rezultate. Slika 18 i graf 6 pokazuju da fluorescencija raste sa dodatkom liganda. Takav rezultat može biti objašnjen time da kanadalin jako apsorbira u istom valnom području kao i acetilkolinesteraza, stoga povećanjem njegove koncentracije raste i fluorescencija, te nisu dobivene valjane vrijednosti konstante vezanja (Slika 19). Slika 17 prikazuje pogrešku mjerenja čime je pokazano da je mjerenje dobro odrađeno.

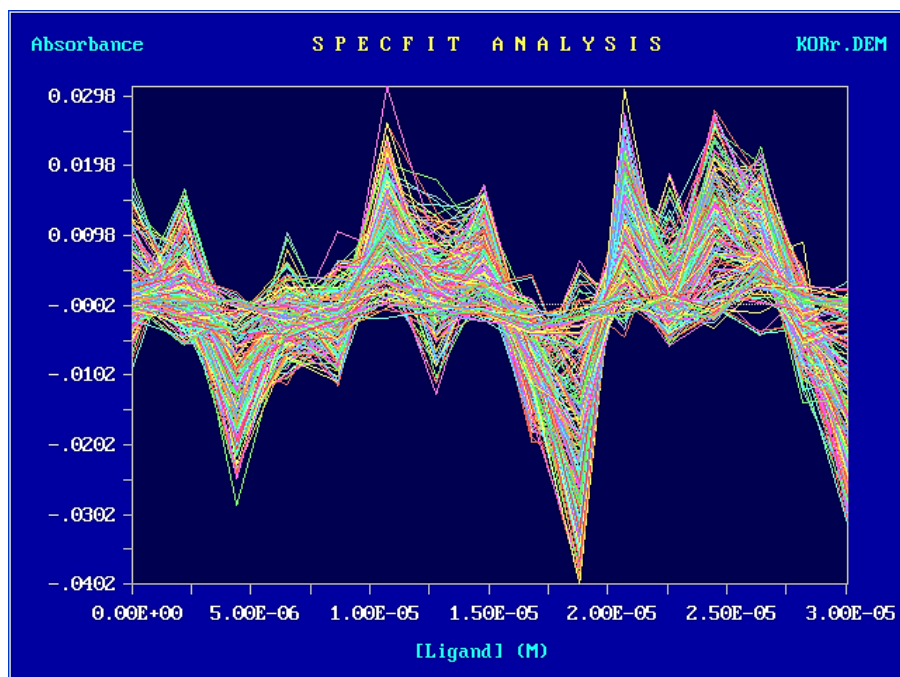
4.1.4. Koridalin



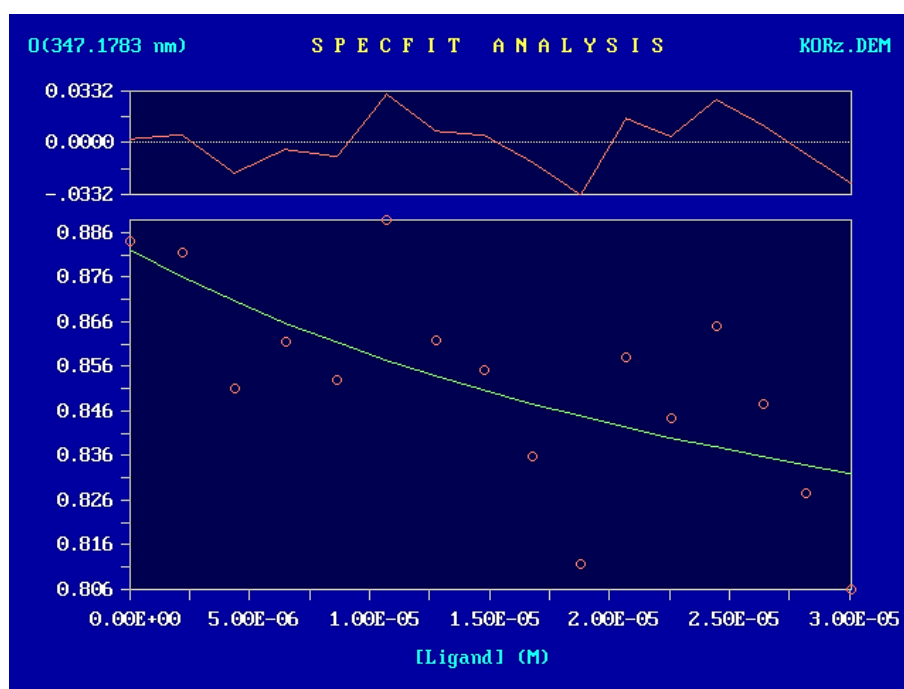
Slika 20. Apsorpcijski spektri otopina acetilkolinesteraze i koridalina



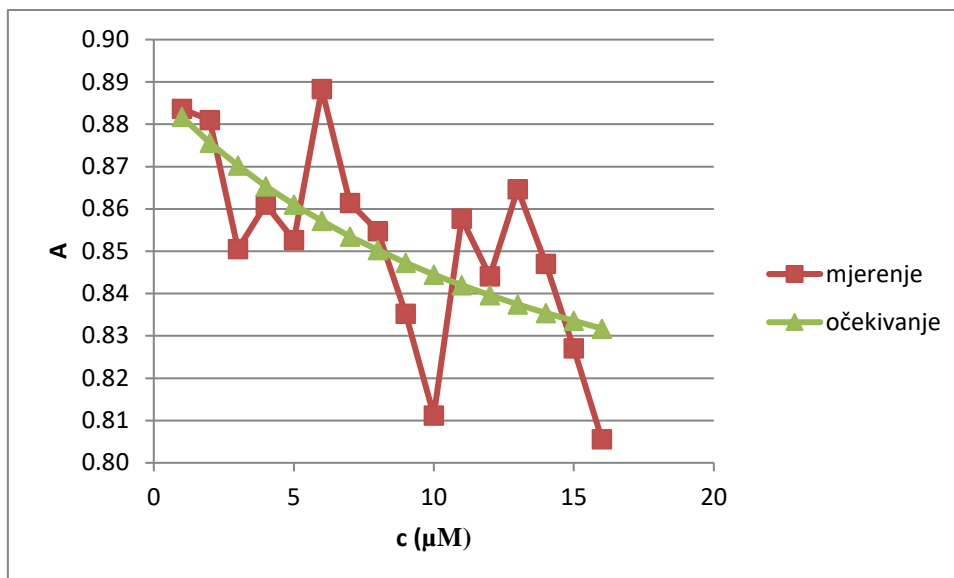
Graf 7. Prikaz apsorpcijskih spektara svih 16 uzoraka različitih koncentracija koridalina



Slika 21. Prikaz apsorbancije u odnosu na koncentraciju berberina (pogreška mjerenja)



Slika 22. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije koridalina na valnoj duljini od 347 nm



Graf 8. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije (μM) berberina na valnoj duljini od 345 nm

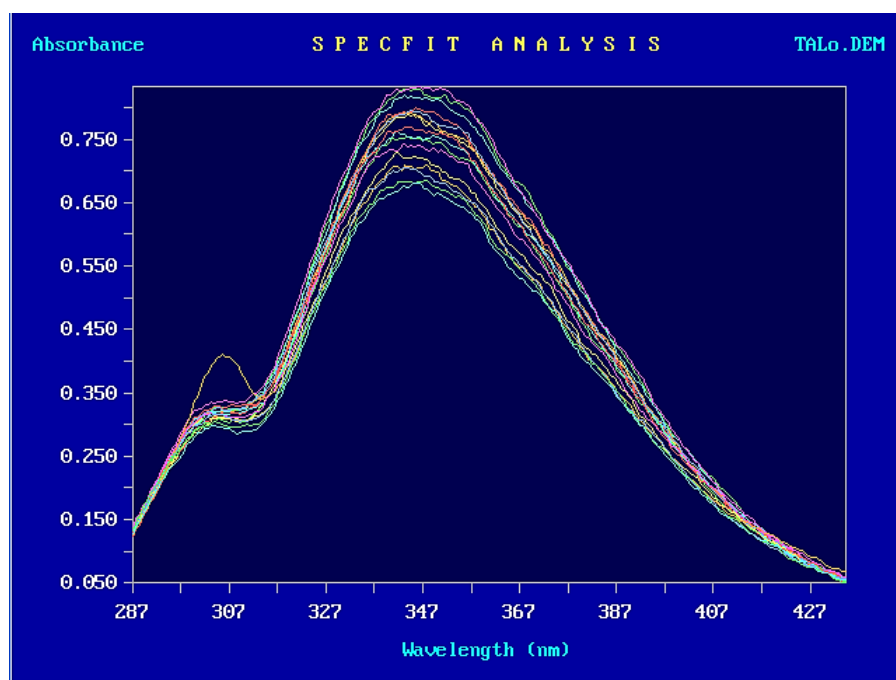
KOR.DEM		SPECFIT MODEL MENU			09-01-2017
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	σ(log B)
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	4.40533D+00	2.63821D-01

Slika 23. Prikaz modela koji je korišten u analizi te konstanta vezanja sa pogreškom

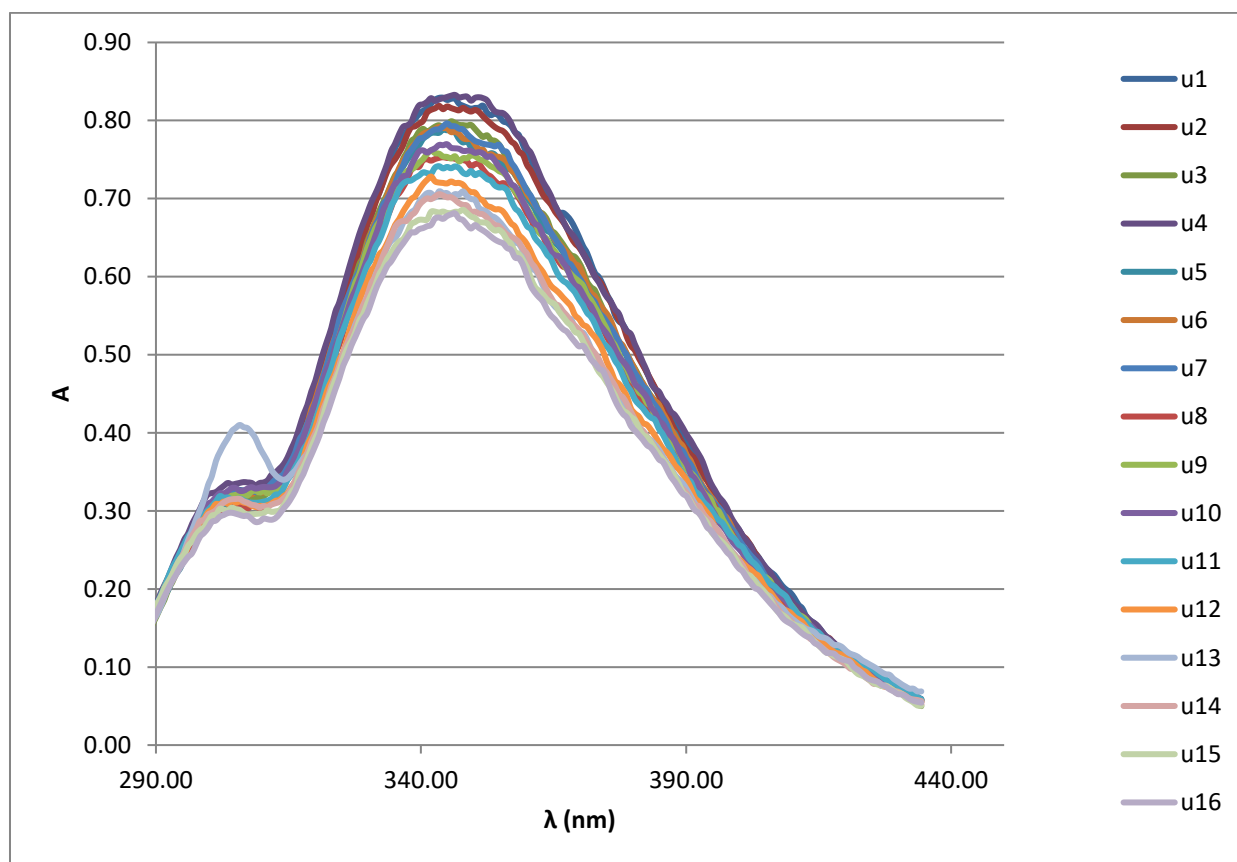
Slika 21 prikazuje pogrešku mjerenja čime je pokazano da je mjerenje dobro odrađeno. Iz dobivenih podataka može se zaključiti kako koridalina ima utjecaj na acetilkolinesterazu. Iz apsorpcijskih spektara na slici 20 i grafu 7 vidi se da se povećanjem koncentracije koridalina smanjuje fluorescencija acetilkolinesteraze, a isto pokazuju slika 22 i graf 8. Na slici 23 prikazan je i logaritam konstante vezanja K_d , iz čega slijedi:

$$K_d = 10^{4.4} \pm 26 \%$$

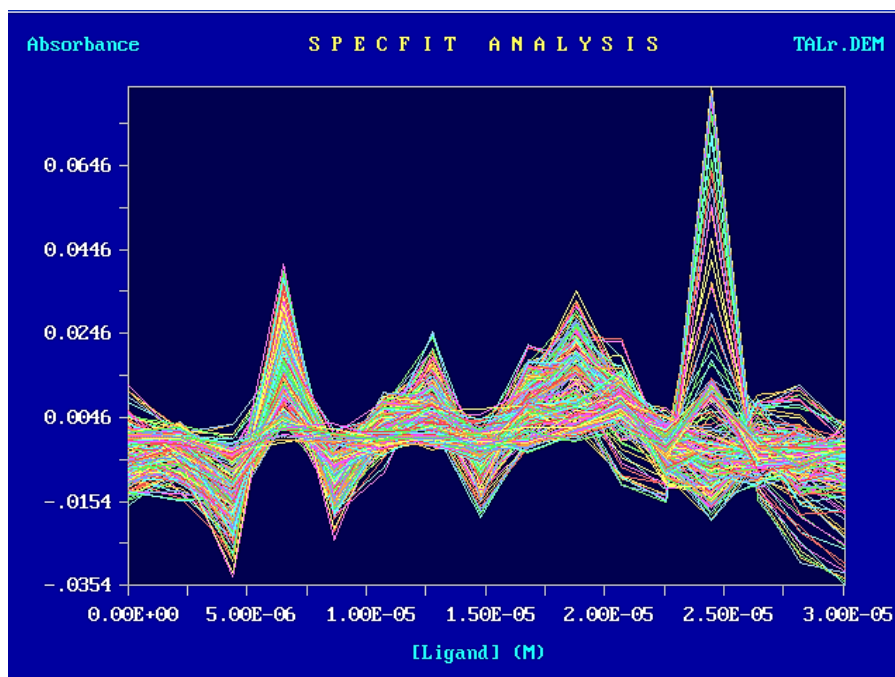
4.1.5. Taliktrikavin



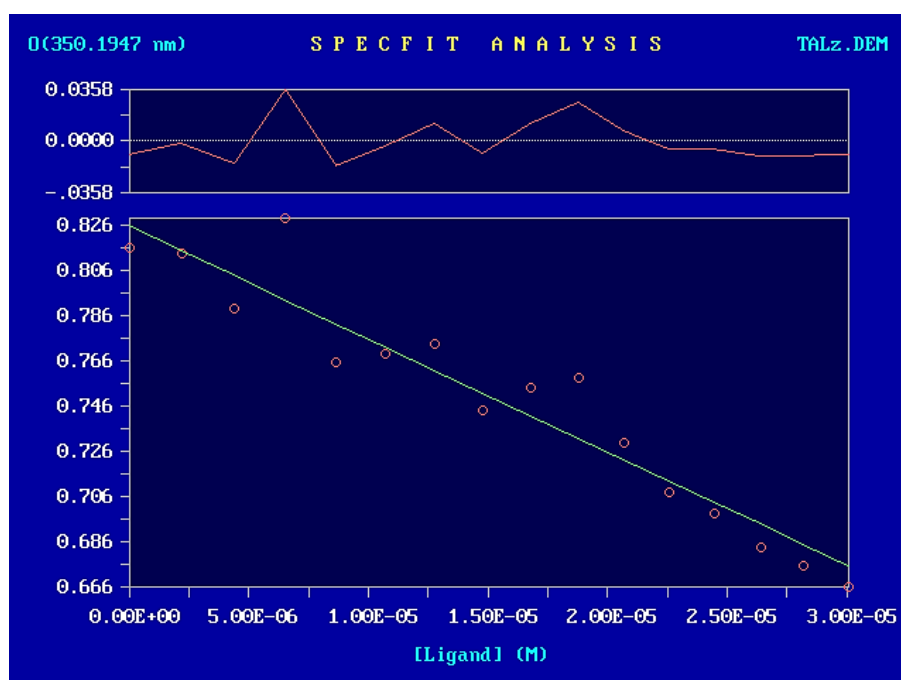
Slika 24. Apsorpcijski spektri otopina acetilkolinesteraze i taliktrikavina



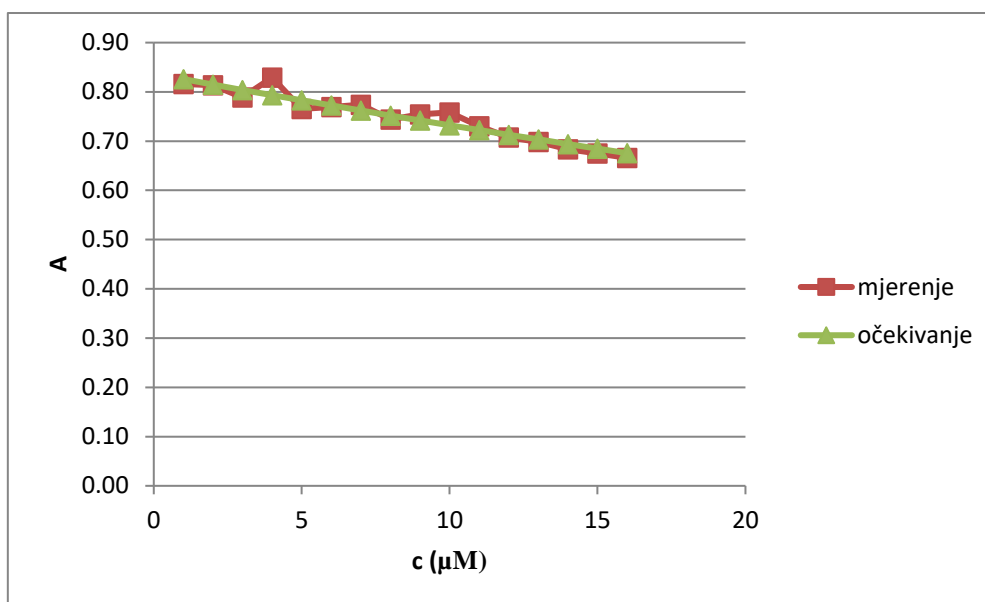
Graf 9. Prikaz apsorpcijskih spektara svih 16 uzoraka različitih koncentracija taliktrikavina



Slika 25. Prikaz apsorbancije u odnosu na koncentraciju taliktrikavina (pogreška mjerenja)



Slika 26. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije taliktrikavina na valnoj duljini od 350 nm



Graf 10. Odnos apsorbancije i povećanja koncentracije (μM) taliktrikavina na valnoj duljini od 335 nm

TAL.DEM		SPECFIT MODEL MENU			09-01-2017
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	σ(log B)
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.000000+00	0.000000+00
010	n	u	f	0.000000+00	0.000000+00
110	y	u	v	8.12813D-01	3.10893D+00

Slika 27. Prikaz modela koji je korišten u analizi te konstanta vezanja sa pogreškom

Slika 9 prikazuje pogrešku mjerenja čime je pokazano da je mjerenje dobro odrađeno. Prikazani podatci mjerenja (Slika 24, graf 9, slika 26 i graf 10) sa taliktrikavinom dovode nas do zaključka da je koncentracija alkaloida bila premala zbog slabe topljivosti u tris puferu, stoga je sljedeće mjerenje rađeno s 10%-tnom otopinom DMSO. Konstanta prikazana na slici 27 zbog navedenog nije valjana. Mjerenje sa 10%-tnom otopinom DMSO-a nije pokazalo zadovoljavajuće rezultate.

4.2. MST MJERENJA

Termoforetska mjerenja rađena su na uređaju Monolith NT.115. Prva mjerenja su rađena sa otopinom kanadalina u tris puferu u koncentraciji od 1 mM, međutim kako dobiveni rezultati nisu bili valjani, u sljedećim mjerenjima korištene su otopine alkaloida u DMSO – u koncentracije 10 mM. Prva korištena otopina bila je otopina taliktrikavina. Nakon što je je otopina raspoređena u eppendorfice, dodana je otopina enzima u tris puferu. Odmah nakon dodatka enzima otopina se zamutila i došlo je do taloženja alkaloida. Takva otopina nije mogla biti korištena za MST. S obzirom da su alkaloidi bazični spojevi da te promjenom pH može doći do njihove kristalizacije umjesto otopine enzima u tris puferu (pH = 0) alkaloidima je dodan fosfatni pufer (pH = 7,4) kako bi se provjerio ishod. Usprkos smanjenom pH došlo je do taloženja alkaloida. Sljedeći korak bio je dodavanje destilirane vode (pH = 7,0). Nakon dodatka nije došlo do taloženja alkaloida, međutim nije poznato kako bi se enzim otapao i ponašao u destiliranoj vodi se od daljnjih mjerenja pomoću MicroScale Termoforeze odustalo.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je utvrditi da li novo izolirani alkaloidi slični berberinu inhibiraju enzim acetilkolinesterazu, te kao takvi mogu biti potencijalni lijekovi u Alzheimerovoj bolesti. Dobiveni rezultati pokazali su da sam berberin ima ujecaj na inhibiciju acetilkolinesteraze sa konstantom vezanja od $10^{5,13}$. Od berberinu sličnih alkaloida učinak na inhibiciju acetilkolinesteraze pokazao je još i alkaloid koridalin sa konstantom vezanja $10^{4,4}$. Za ostala tri alkaloida koji su bili podvrgnuti fluorimetrijskim mjerenjima nisu dobiveni rezultati koji bi se mogli dovoljno dobro interpretirati. MST je bila druga metoda kojom je pokušano dobivanje boljih rezultata. Zbog slabe toljivosti alkaloida ni ova metoda nije nam dala pozitivne rezultate. Na kraju se ne može zaključiti imaju li alkaloidi kanadin, kanadalin i taliktrikavin utjecaj na inhibiciju acetilkolinesteraze ili ne, međutim može se zaključiti da fluorimetrija i MST u izabranim uvjetima nisu pogodne metode za mjerenje njihove inhibicije enzima acetilkolinesteraze.

6. LITERATURA

Alzheimer Disease, <http://emedicine.medscape.com>, pristupljeno 30.08.2017.

Canadoline, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>, pristupljeno 30.08.2017.

Chlebek J, Macáková K, Cahlíkovi L, Kurfürst M, Kunes J, Opletal L. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae), *Nat Prod Commun*, 2011, 6, 607-610.

Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol*, 2013, 11, 315-335.

Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact.*, 2010, 187, 10-22.

Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1999, 66, 137-147.

Hegyi G, Kardos J, Kovács M, Csizmadia AM, Nyitray L, Pál G, Radnai L, Reményi A, Venekei I. Introduction to Practical Biochemistry, E-learning scientific content development in ELTETTK, 2013, str. 51-53.

McGleenon BM, Dynan KB, Passmore AP. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*, 1999, 48, 471-480.

Measure with the Monolith, <http://nanotempertech.com>, pristupljeno 03.09.2017.

Meyer A, Imming P. R (-) Canadoline as first secoberbine alkaloid from *Corydalis cava*. *Phytochem Lett* 1, 2008, 168-170.

Rueffer M, Bauer W, Zenk MH. The formation of corydaline and related alkaloids in *Corydalis cava* *in vivo* and *in vitro*. *Can J Chem*, 1994, 72, 170-175.

Terry AV, Buccafusco JJ. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306, 821-827.

Willemsena MJ, Andréa T. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J Molec Struct*, 2014, 1077, 101-113.

Xiang J, Yu C, Yang F, Yang L, Ding H. Conformation-activity studies on the interaction of berberine with acetylcholinesterase: Physical chemistry approach. *Progress Nat Sci* 2009, 19, 1721-1725.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Alzheimerova bolest danas je vodeći oblik demencije kod osoba starijih od 65 godina. Simptomi bolesti značajno narušavaju kvalitetu života kako samog bolesnika tako i članova njegove bliže obitelji. S obzirom da patofiziologija bolesti još uvijek nije sasvim razjašnjena terapije bolesti danas se svodi na simptomatsko liječenje. Najpoznatija i najraširenija skupina lijekova u liječenju Alzheimerove bolesti danas su inhibitori acetilkolinesteraze. Cilj ovoga rada bio je istražiti djelovanje alkaloida sličnih berberinu na inhibiciju acetilkolinesteraze. U istraživanje bila su uključena četiri alkaloida; kanadin, kanadalin, koridalin i taliktrikavin. Pozitivne rezultate pokazao je alkaloid koridalin, dok za ostale alkaloidne nisu dobiveni valjani rezultati zbog njihove velike apsorpcije u području apsorpcije samog enzima.

Alzheimer's disease today is the leading form of dementia in persons over the age of 65. Symptoms of illness significantly impair the quality of life of the patient as well as members of his immediate family. Given that the pathophysiology of the disease is still not entirely clarified, the disease is now reduced to symptomatic treatment. The most well-known and most widely-used group of drugs in the treatment of Alzheimer's disease today are acetylcholinesterase inhibitors. The aim of this paper was to investigate the action of berberin-like alkaloids to inhibit acetylcholinesterase. Four alkaloids were included in the study; canadine, canadaline, corydaline and thalictricavine. Positive results showed alkaloid corydaline, while other alkaloids did not get a valid result due to their high absorption in the absorption of the enzyme itself.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

INHIBITORNI UČINAK ALKALOIDA IZ BILJNE VRSTE *Corydalis cava* (L.) Schweigg.& Körte NA ACETILKOLINESTERAZU

Matea Dvorščak

SAŽETAK

Alzheimerova bolest danas je vodeći oblik demencije kod osoba starijih od 65 godina. Simptomi bolesti značajno narušavaju kvalitetu života kako samog bolesnika tako i članova njegove bliže obitelji. S obzirom da patofiziologija bolesti još uvijek nije sasvim razjašnjena terapije bolesti danas se svodi na simptomatsko liječenje. Najpoznatija i najraširenija skupina lijekova u liječenju Alzheimerove bolesti danas su inhibitori acetilkolinesteraze. Cilj ovoga rada bio je istražiti djelovanje alkaloida sličnih berberinu na inhibiciju acetilkolinesteraze. U istraživanje bila su uključena četiri alkaloida; kanadin, kanadalin, koridalin i taliktrikavin. Pozitivne rezultate pokazao je alkaloid koridalin, dok za ostale alkaloidne nisu dobive valjani rezultati zbog njihove velike apsorpcije u valnom području apsorpcije samog enzima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 27 grafičkih prikaza, 1 tablica i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, alkaloidi, acetilkolinesteraza, inhibicija

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. Sc. Marijana Zovko Končić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Mario Gabričević, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Tin Weitner, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ACETYLCHOLINESTERASE-INHIBITORY EFFECT OF ALKALOIDS FROM *Corydalis cava* (L.) Schweigg.& Körte

Matea Dvorščak

SUMMARY

Alzheimer's disease is the leading form of dementia in persons over the age of 65. Symptoms of illness significantly impair the quality of life of the patient as well as members of his immediate family. Given that the pathophysiology of the disease is still not entirely clarified, the disease is now reduced to symptomatic treatment. The most well-known and most widely-used group of drugs in the treatment of Alzheimer's disease today are acetylcholinesterase inhibitors. The aim of this paper was to investigate the action of berberin-like alkaloids on acetylcholinesterase. Four alkaloids were included in the study; canadine, canadaline, corydaline and thalictricavine. Positive results showed alkaloid corydaline, while other alkaloids did not get a valid result due to their high absorption in the wavelengths of absorption of the enzyme itself.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 27 figures, 1 table and 14 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Alzheimer's disease, alkaloids, acetylcholinesterase, inhibition

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Gabričević, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tin Weitner, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.